2005年11月 改訂
2005年10月 改訂

研究用試薬

MORINAGA

モリナガ FASPEK

牛乳 測定キット
（β-ラクトグロブリン）

取扱説明書

【お願い】
製品をご使用になる前に、
必ずお読みください。

MIoBS 株式会社 森永生科学研究所
横浜市金沢区幸浦2-1-16　〒236-0003

「特許出願中」

【キットの構成】

	品　　名	容　量	数　量
A	抗体固相化モジュール	8ウェル×6本	2パック
B	牛乳標準品（50 ng/mL）※1	1 mL	2本
C	酵素標識抗 β-ラクトグロブリン抗体溶液	13 mL	1本
D	酵素基質溶液（TMB 溶液）	13 mL	1本
E	反応停止液（1N 硫酸）	13 mL	1本
F	検体希釈液（20 倍濃縮液）※2	50 mL	2本
G	洗浄液（20 倍濃縮液）	50 mL	1本
H	抽出用A液（20 倍濃縮液）※2	55 mL	1本
I	抽出用B液（20 倍濃縮液）※2	55 mL	1本
	モジュール用フレーム		1個
	モジュール用フタ		1枚

※1.標準品は(株)ニッポン・ジーンで製造されています。

※2.F 検体希釈液、H 抽出用A液、I 抽出用B液は「特定原材料抽出用試薬」セットとして(株)森永生科学研究所より別途入手可能です。

【キットの特徴】

1．マイクロプレートを使用したEIAサンドイッチ法を用いているため特別な施設・設備等を必要とせず、通常の実験室で測定可能です。
2．このキットは検体中のβ-ラクトグロブリンを指標に牛乳総タンパク質濃度を測定するキットです。
3．測定溶液中の牛乳総タンパク質として0.78 ng/mLから測定可能です。
4．抽出液に界面活性剤と還元剤を加えることで、従来のキットに比べタンパク質を高回収率で測定することができます。尚この測定法は、Watanabe [1] らの方法をもとに開発されました。

⚠注意　加工品の場合には目的タンパク質の抽出効率の低下や、目的タンパク質の変性などの理由により検出感度が低下することがあります。

【交差反応】

山羊乳、羊乳タンパク質と交差反応を示します。

【測定する際の注意事項】

1．キットの試薬にはアレルゲン性を有する牛乳タンパク質やウシ血清アルブミンを使用しています。これらのタンパク質にアレルギーのある方は本キットを使用する際には試薬の取扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行って下さい。
2．試薬は全て室温（20～25℃）に戻してから使用して下さい。
3．測定は二重以上の測定で行って下さい。
4．反応時間を厳守して測定して下さい。
5．標準溶液および検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないよう注意して下さい。ピペットマン等のピペッティング器具は、定期的に検定して下さい。
6．実験に用いる器具類は汚染が無いよう、使用前に十分洗浄して下さい。吸光度のバラツキや、バックグラウンドの上昇の原因になります。検体希釈液の調製には、使い捨てのプラスチックピペットや使い捨てチューブなどを使用すると、汚染の影響を低減することができます。またウェルへの分注の際に用いるピペットチップは、フィルター付きのものをお勧めします。
7．本キットによる測定は非常に高感度なため、埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。汚染を防ぐため、マイクロプレート操作後は必ず付属のモジュール用フタをして下さい。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
8．各反応終了後の洗浄操作は非常に重要です。洗浄が不十分だと、バックグラウンドが高くなる可能性があります。ウェル内に液が残存していないことを十分確認しながら洗浄操作を行って下さい。その為、アスピレーションによって液を除いたり、ペーパータオルなどを使用してマイクロプレートをよく叩いて内容液を除いて下さい。洗浄後は速やかに次の試薬

を分注して下さい。

9．酵素反応は遮光下で行って下さい。

10. プレートの底はなるべく触れないようにして下さい。もし指紋等で底面が曇った場合は、十分に拭き取ってから吸光度を測って下さい。汚れで吸光度が正しく測定できない場合があります。

11．本キットは高濃度の界面活性剤や還元剤を含んでおりますので、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。

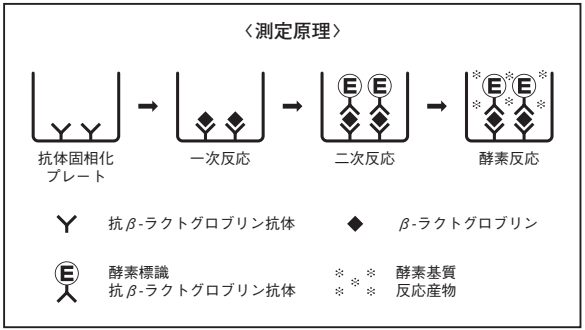
12. 本キットは高濃度の還元剤を含むため、ご使用の際特有の臭気を感じることがあります。そのため、検体の調製・抽出の際にはドラフトの使用をお勧めします。さらに、測定時にモジュール用フタをかぶせたプレートをラップで覆うことにより臭気が軽減されます。

【測定原理】

一次反応：試料中のβ-ラクトグロブリンが、プレート上の固相化抗β-ラクトグロブリンポリクローナル抗体に結合し、［固相化抗β-ラクトグロブリン抗体／β-ラクトグロブリン］の複合体を形成する。

二次反応：酵素標識抗β-ラクトグロブリンポリクローナル抗体が複合体上のβ-ラクトグロブリンに結合する。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色する。
得られた吸光度に対応する牛乳タンパク質濃度を標準曲線から算出する。



【その他必要な器具・装置】

1．マイクロピペット
　100 μL～1000 μLの範囲が必要です。
2．メスシリンダー
3．ポリプロピレン製チューブ
　標準溶液の調製及び検体の希釈に使用します。
4．プレートリーダー
　単波長の場合：450 nm
　2波長の場合：主波長450 nm、副波長600～650 nmが測定できるもの。
5．振とう機

【試薬の調製法】

1．固相化モジュール

A 抗体固相化モジュールをアルミパウチから出さず室温に戻し、その後開封して下さい。

開封後は直ちに使用して下さい。

2．C, D, Eの試薬はそのまま使用します。使用前に室温に戻して下さい。

C 酵素標識抗β-ラクトグロブリン抗体溶液

D 酵素基質溶液

E 反応停止液

3．標準溶液の調製

標準溶液（50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0 ng/mL）を調製します。

B 牛乳標準品（50 ng/mL）を下記に示すように検体希釈液Ⅱ（「6．検体希釈液Ⅱの調製」参照）を用いて、25 ng/mLから0.78 ng/mLの希釈系列を調製します。

ブランク（0 ng/mL）は検体希釈液Ⅱを用います。

標準溶液（ng/mL）	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	ブランク
牛乳標準品（50 ng/mL）	原液	⇨ 500（μL）	500	500	500	500	500	—
検体希釈液Ⅱ	—	500（μL）	500	500	500	500	500	500

※ 標準溶液の希釈は用時調製して下さい。また、測定毎に標準曲線を作成して下さい。

4．検体抽出液の調製

F 検体希釈液、H 抽出用A液、I 抽出用B液、精製水を1：1：1：17の比率で混合します。必要量を調製して下さい。

※ H 抽出用A液に沈殿が生じている場合は加温溶解してか

らご使用下さい。溶解後は室温で保存可能です。

※ ここで調製した検体抽出液はモリナガ FASPEK 特定原材料測定キットの検体抽出液であり、それ以前に開発された特定原材料測定キットでは使用できません。

（例：24 検体測定する場合）

F 検体希釈液（20 倍濃縮液） ……	25 mL
H 抽出用 A 液（20 倍濃縮液） ……	25 mL
I 抽出用 B 液（20 倍濃縮液） ……	25 mL
精製水 ……	425 mL
	500 mL

5．検体希釈液Ⅰの調製

F 検体希釈液を精製水で 20 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

※ 検体希釈液Ⅱの調製及び上清又はろ過液の希釈に用います。

（例：24 検体測定する場合）

F 検体希釈液（20 倍濃縮液） ……	25 mL
精製水 ……	475 mL
	500 mL

6．検体希釈液Ⅱの調製

上記 4．で調製した検体抽出液を検体希釈液Ⅰで 20 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

※ 標準溶液の調製及び測定溶液の再希釈に用います。

（例：24 検体測定する場合）

検体抽出液 ……	25 mL
検体希釈液Ⅰ ……	475 mL
	500 mL

7．洗浄液の調製

G 洗浄液を精製水で 20 倍に希釈します。

必要量を調製して下さい。

※ 洗浄操作には調製済み洗浄液を使用します。

【検体の調製法・抽出法】

1．検体をミキサー等で粉砕し、均質化操作を行います。
2．均質化された検体1 g をプラスチック製50 mL容遠心管等に取り、検体抽出液19 mL（【試薬の調製法】4. 検体抽出液の調製参照）を加えよく振り混ぜて混合します。この際に、あまり泡立たせないよう注意しながら、ボルテックス等を用いて検体を分散させます。
3．遠心管を横にして振とう機で一晩（12時間以上）振とうしながら抽出します(90 ～ 110往復ストローク/分、室温、振とう幅3cm程度)。振とうにより、液が遠沈管の両端に打ち付けるように調整します。時々遠沈管の上下を入れ替える等をして、液面に沿って付着する検体を分散させます。
4．抽出液のpHを確認し、必要であれば中性付近（pH 6.0 ～ 8.0）になるよう調整します。(pH試験紙で結構です。)
※このとき調整に使用したアルカリ（あるいは酸）溶液の容量を加味し、最終的な特定原材料由来のタンパク質含有量を算出して下さい。
5．3,000 × g で20分間（室温）遠心分離し、上清を分取します。沈査が得られない場合は上清をろ紙でろ過し､ろ過液とします。
6．上清又はろ過液を検体希釈液Ⅰ（【試薬の調製法】5 . 検体希釈液Ⅰの調製 参照）を用い20倍に希釈し、測定溶液とします。(例；検体希釈液Ⅰ 950 μLに対し、上清又はろ過液50 μLを添加します。)
7．更に希釈する場合は、検体希釈液Ⅱ（【試薬の調製法】6 . 検体希釈液Ⅱの調製 参照）を用い希釈し、測定溶液とします。

【測定法】

(一次反応)

1．A抗体固相化モジュールをアルミパウチを開封せずに室温に戻し付属のモジュール用フレームに必要量をセットします。

2．各ウェルに標準溶液(0, 0.78 ～ 50 ng/mL)、測定溶液を 100 μL ずつ添加します。

3．付属のモジュール用フタをして室温で正確に1時間静置して反応させます。

(二次反応)

1．ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 250 ～ 300 μL ずつの洗浄液で6回洗浄します。

2．C酵素標識抗 β-ラクトグロブリン抗体溶液を各ウェルに 100 μL ずつ分注します。

3．フタをして室温で正確に30分間静置して反応させます。

(酵素反応)

1．ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 250 ～ 300 μL ずつの洗浄液で6回洗浄します。

2．D酵素基質溶液を各ウェルに 100 μL ずつ分注します。

3．フタをして室温遮光下で正確に10分間静置して反応させます。

4．E 反応停止液を各ウェルに 100 μL ずつ分注し酵素反応を停止させます。

5．プレートリーダーを用い主波長450 nm、副波長600 ～ 650 nm の条件で各ウェルの吸光度を測定します。
※ 酵素反応停止後は30分以内に吸光度を測定して下さい。

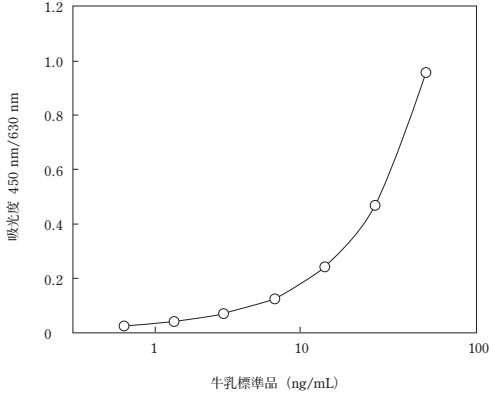
6．標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中の牛乳総タンパク質濃度を求めます。
※ 牛乳総タンパク質濃度の算出法は、下記の【牛乳タンパク質濃度の算出法】を参照して下さい。

〈測定のフローチャート〉	
（試薬、検体の調製）	□ 洗浄液、検体抽出液、検体希釈液Ⅰ及び検体希釈液Ⅱを調製 標準溶液（0, 0.78 ～ 50 ng/mL）、測定溶液の準備
	⬇
（一次反応）	□ 標準溶液、測定溶液（100 μL/ウェル） ＊測定は二重以上
	⬇
	□ 反応（室温, 1時間）
	⬇
	□ 洗浄（250 ～ 300 μL/ウェル, 6回）
	⬇
（二次反応）	□ 酵素標識抗 β-ラクトグロブリン抗体溶液(100 μL/ウェル)
	⬇
	□ 反応（室温, 30 分）
	⬇
	□ 洗浄（250 ～ 300 μL/ウェル, 6回）
	⬇
（酵素反応）	□ 酵素基質溶液（100 μL /ウェル）
	⬇
	□ 反応（室温, 10 分）　＊ 遮光下で反応
	⬇
（反応停止）	□ 反応停止液（100 μL/ウェル）
	⬇
（測　　定）	□ 吸光度測定　＊ 反応停止後 30 分以内に測定 （主波長：450 nm, 副波長：600 ～ 650 nm）

【牛乳タンパク質濃度の算出法】

1．測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
2．片対数方眼紙を用い、標準溶液の濃度を横軸に、吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。また、グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を作成する場合は、4-パラメーターを使用することをお勧めします。
3．標準曲線より各測定溶液の濃度を読み取ります。
4．測定溶液の吸光度が標準曲線の吸光度より高い場合は、さらに希釈して（【検体の調製法・抽出法】7．参照）、再度測定して下さい。

牛乳（β-ラクトグロブリン）標準曲線の例



※ 測定溶液の濃度（ng/mL）と、検体中の牛乳総タンパク質濃度（μ g/g）の関係は次の式で求められます。

$$\mu g/g = \frac{\text{測定溶液の濃度[ng/mL]} \times \text{（抽出時の希釈倍率）} \times \text{（測定時の希釈倍率）}}{1{,}000}$$

【使用上又は取扱い上の注意】

1．本キット内の試薬は、研究目的以外に使用しないで下さい。
2．有効期限の過ぎたキットは使用しないで下さい。
3．ロットの異なる試薬や本キット以外の試薬を組み合わせて使用しないで下さい。
4．測定の際は必ず標準溶液を同時に測定し、測定の都度標準曲線を作成して下さい。
5．キットに組み込まれている試薬類は凍結させないで下さい。
6．保存中や反応中は強い光にさらさないで下さい。
7．反応停止液（1N 硫酸）が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けて下さい。

【キットの保存条件及び有効期間】

1．2～8℃で光の当たらない場所に保管して下さい。
2．有効期間(未開封)はキット外箱のラベルに記載してあります。
3．一度開封した試薬は、必ず一週間以内に使用して下さい。

【保　証】

1．本キットを使用して得られた結果の評価及び利用は、お客様の責任と判断において行って下さい。
2．測定結果を利用し、その結果生じた損害及び損失については、当社は一切責任を負いません。
3．本キット以外の試薬または原材料を使用されて得られた結果については、当社は一切保証いたしません。
4．万一、試薬に品質上の瑕疵があると当社が判断した場合は、新しい製品とお取り替えいたします。

【参考文献】

(1) Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka S., Mamegosi, S., Honjoh, T. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. J Immunol. Methods 2005 ; 300 : 115-123.